



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 198 49 643 A 1

⑤ Int. Cl.⁷:
C 07 K 16/00
C 12 N 5/12
C 12 N 15/63

②① Aktenzeichen: 198 49 643.5
②② Anmeldetag: 29. 10. 1998
②③ Offenlegungstag: 4. 5. 2000

DE 198 49 643 A 1

⑦① Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE	⑦② Erfinder: Kleinschmidt, Jürgen, 69245 Bammatal, DE; Wobus, Christiane, 69126 Heidelberg, DE; Kern, Andrea, 74930 Ittlingen, DE
⑦④ Vertreter: Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea Schübler, 81825 München	⑤⑥ Entgegenhaltungen: J. Virol., 72(4), S. 3241-3247, April 1998;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ An das AAV-Kapsid bindender, den Zelltropismus verändernder Antikörper und Verfahren zum gerichteten Gentransfer
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper oder Fragmente davon, die an das Kapsid von Adeno-assoziierten Viren binden, wodurch die Bindung des Virus an den Virusrezeptor der ursprünglichen Zielzelle verhindert wird. Dieser Antikörper oder das Fragment davon können außerdem mit einem gewünschten Rezeptorliganden fusioniert werden. Nach Bindung eines solchen Antikörpers an das AAV-Kapsid wird ein AVV erhalten, das über einen veränderten Tropismus verfügt, also - in Abhängigkeit von dem fusionierten Liganden - an eine neue Zielzelle binden kann und zur Konstruktion eines AAV-Vektors für gerichteten Gentransfer verwendet werden kann.

DE 198 49 643 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper oder Fragmente davon, die an das Kapsid von Adeno-assoziierten Viren (AAV) binden, wodurch die Bindung des Virus an den Virusrezeptor der ursprünglichen Zielzelle verhindert wird. Diese(r) Antikörper oder (das) Fragment(e) davon können außerdem als Adaptoren für die Fusionierung mit einem gewünschten Rezeptorliganden dienen. Nach Bindung eines solchen Antikörpers an das AAV-Kapsid wird ein AAV erhalten, das über einen veränderten Tropismus verfügt, also – in Abhängigkeit von dem fusionierten Liganden – an eine neue Zielzelle binden kann. Die vorliegende Erfindung betrifft somit ferner AAV-Vektoren, an deren Kapsid der erfindungsgemäße Antikörper oder das Fragment davon gebunden sind. Diese Vektoren können für einen gerichteten Gentransfer verwendet werden. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum gerichteten Gentransfer unter Verwendung dieses AAV-Vektors.

Das erste Ereignis bei einer viralen Infektion stellt die Bindung des Virus an die Wirtszelloberfläche dar. Die Zelloberflächenmoleküle, an die die Viren binden, werden Virusrezeptoren genannt, während die viralen Proteine, die an dieser Bindung beteiligt sind, als virale Anheftungsproteine (VAP = "viral cell attachment protein") oder virale Liganden bezeichnet werden. Das Studium der Interaktion zwischen Virusrezeptoren und viralen Liganden hat in den letzten Jahren wachsendes Interesse gefunden, da aus den Kenntnissen dieser Interaktion nicht nur wichtige Hinweise für die Prävention von viralen Infektionen gewonnen, sondern solche Kenntnisse u. U. auch für die gezielte Manipulation der Infektion mit viralen Vektoren genutzt werden können.

Die Identifizierung einer größeren Anzahl viraler Rezeptoren förderte eine Reihe von Gemeinsamkeiten bei der Infektion verschiedener Viren zutage. So benutzen verschiedene Viren Mitglieder derselben Familie von Zelloberflächenmolekülen als virale Rezeptoren, wie z. B. Mitglieder der IgG-Superfamilie, der "multimembrane spanning transporter", der Integrine oder von Wachstumsrezeptoren. Außerdem wurde in einigen Fällen klar, daß dieselben Viren nicht nur mehrere Rezeptormoleküle benutzen können, sondern für die erfolgreiche Infektion der Zielzelle tatsächlich die Interaktion mit mehreren Rezeptoren auch benötigt wird. Um das Infektionsereignis zu verstehen und gegebenenfalls manipulieren zu können, ist es daher vor allem notwendig, die viralen Anheftungsproteine und möglichst die Anheftungssequenzen zu kennen. Innerhalb der Familie der Parvoviren wurde für das autonome Parvovirus B19 das Erythrozyten P Antigen als Rezeptor beschrieben (Brown et al., Science 262, S. 114–117, 1993) und für das helferabhängige AAV-2 wurde Heparan Sulfat Proteoglycan als zelluläres Rezeptormolekül ermittelt (Summerford und Samulski, J. Virol. 72 (2), S. 1438–1445, 1998).

Für einen Gentransfer werden bis heute vorzugsweise virale Vektoren, beispielsweise retrovirale Vektoren, adenovirale Vektoren oder Vektoren, die von Adeno-assoziierten Viren abgeleitet sind, benutzt. Ein Nachteil der bisherigen Verfahren liegt darin, daß es bisher kaum möglich war, das Virus so zu modifizieren, daß (nur) die gewünschte Zielzelle transduziert wird (gerichteter Gentransfer) und die unerwünschte Transduktion von Nicht-Zielzellen vermieden wird. Eine Erweiterung bzw. Veränderung des Zielzellspektrums (d. h. des Tropismus) könnte nicht nur die Effizienz des Gentransfers erhöhen, sondern darüber hinaus sowohl ex vivo als auch in vivo Zugang zu schwer transduzierbaren Zelltypen schaffen. Somit kommt der Entwicklung von möglichst selektiven Gentransfermethoden eine immer größere Bedeutung zu. Dabei tritt neben den Elementen der intrazellulären Spezifität, die beispielsweise durch Steuerung der Genexpression mittels gewebe- oder zellspezifischer Promotoren erreicht werden kann, immer mehr der gerichtete Gentransfer in den Vordergrund.

Zu den bisher für einen Gentransfer verwendeten Vektoren zählen auch die auf AAV basierenden Vektoren. AAV ist ein menschliches Parvovirus, das aus einem nicht-umhüllten ikosaedrischen Kapsid mit einem einzelsträngigen DNA-Genom (ca. 4,6 Kb) besteht. Es besitzt einen breiten Wirtsbereich und ist in der Lage, sein Genom in eine bevorzugte Stelle des Wirtszellgenoms zu integrieren, wenn kein Helfervirus vorhanden ist (Kotin et al., PNAS USA 87(6), S. 2211–2215, 1990). Die Überinfektion mit einem Helfervirus (z. B. Adenovirus oder Herpesvirus) mobilisiert das latente AAV und induziert eine Amplifikation des AAV-Genoms. Etwa 70% der Bevölkerung haben Antikörper gegen AAV, für das jedoch keine pathogenen Eigenschaften bekannt sind. Die von AAV abgeleiteten Vektoren bestehen lediglich aus den beiden 145 bp langen terminalen Wiederholungen, die die Signale in cis für Replikation, Verpackung und Integration tragen. Zwischen diese beiden Elemente können bis zu ca. 4,5 Kb Fremd-DNA inseriert werden. Zur Verpackung in rekombinante virale Vektoren (rAAV) sind in trans die rep- und cap-Gene, sowie ein Helfervirus erforderlich. Obwohl in den letzten Jahren mehrere verbesserte Verfahren zur Vektorproduktion veröffentlicht wurden, ist die relativ aufwendige Herstellung von AAV-Vektoren immer noch eines der Haupthindernisse für eine breitere Anwendung dieses Vektorsystems. In jüngster Zeit konnte jedoch mit der Herstellung von rAAV ohne Helfervirus eine entscheidende Verbesserung und Vereinfachung des Produktionsverfahrens erzielt werden (Xiao et al., J. Virol. 72(3), S. 2224–2232, 1998).

AAV-Vektoren vereinigen eine Reihe von Vorteilen: Sie enthalten keine viralen Gene, besitzen stabile Kapside, haben einen breiten Wirtsbereich und sind in der Lage, sowohl proliferierende Zellen als auch ruhende Zellen zu infizieren. Insbesondere erlauben sie eine Langzeitexpression von eingeschleusten Genen in die differenzierten Gewebe, z. B. Muskel, Gehirn und Retina, ohne nennenswerte Immunantwort des Wirts.

Die Nachteile der Verwendung von AAV-Vektoren für den Gentransfer liegen jedoch u. a. darin, daß zwar AAV einen breiten Wirtsbereich besitzt, sich jedoch manche Zelltypen, beispielsweise hämatopoietische Stammzellen und dendritische Zellen, nur unbefriedigend transduzieren lassen. Außerdem wäre natürlich für in vivo-Anwendungen grundsätzlich die Möglichkeit eines selektiven Gentransfers mit AAV wünschenswert. Allerdings liegen bisher kaum Kenntnisse über die Determinanten des Zell- und Gewebetropismus von AAV vor, wie z. B. über virale Anheftungsproteine oder Anheftungssequenzen und somit gibt es bisher keine Möglichkeit, AAV hinsichtlich eines selektiven Gentransfers zu manipulieren.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, AAV-Vektoren bereitzustellen, mit denen ein selektiver Gentransfer erreicht werden kann. Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

In der vorliegenden Erfindung wurden monoklonale Antikörper erzeugt, die gegen die Bindungsstellen (Ligandensequenzen) der AAV-Kapsidproteine gerichtet sind. Es konnte gezeigt werden, daß nach Bindung dieser Antikörper an

AAV die Infektion der ursprünglichen Zielzelle unterblieb und die Bindung des AAV an den Virusrezeptor der ursprünglichen Zielzelle blockiert wurde. Desweiteren konnten die Bindungseigenschaften von AAV-Kapsiden dadurch modifiziert werden, daß ausgehend von den vorstehend erwähnten Antikörpern Fusionspolypeptide (z. B. Fab-Fragmente des monoclonalen Antikörpers verknüpft mit neuen Ligandensequenzen) oder Einzelketten-Antikörper-Fusionsproteine hergestellt wurden, und diese an die AAV-Kapside gebunden wurden. Es konnte gezeigt werden, daß AAV-Vektoren mit solchen Kapsiden nur die gewünschte Zielzelle transfizierten und somit für einen selektiven Gentransfer geeignet sind.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung einen monoklonalen Antikörper, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er an das Kapsid eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) bindet und die Bindung des Virus an den Virusrezeptor der ursprünglichen Zielzelle verhindert.

Der hier verwendete Ausdruck "Kapsid" bezeichnet die icosaedrische Proteinhülle, die das AAV-Genom umgibt und typischerweise aus den Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 aufgebaut ist.

Der hier verwendete Ausdruck "ursprüngliche Zielzelle" bezeichnet jede Zelle, an die das unmodifizierte AAV bindet.

Zu den AAV zählen folgende Typen: AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 und AAV-6. Für die Zwecke eines Gentransfers sind dabei folgende Gruppen besonders geeignet: AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 und AAV-6.

Die Verhinderung der Bindung des AAV an den Virusrezeptor der ursprünglichen Zielzelle kann durch mehrere Verfahren bestimmt werden. Verschiedene radioaktive sowie nicht-radioaktive Bindungstests sind in den letzten Jahren entwickelt worden, um die Bindung eines Virus an seine Zielzelle zu bestimmen. Diese Verfahren sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung anwendbar. In den meisten Ansätzen werden in radioaktiven Tests ^{125}I oder ^{35}S markierte Viruspartikel mit Zellen inkubiert und später die mit den Zellen verbleibende Radioaktivität gemessen (Summerford, C and Samulski, R. J., 1998, *Journal of Virology* 72, 1438-1445; Grubman, M. J. et al. 1985, *Journal of Virology* 56, 120-126; Abraham, G. et al. 1988, *Journal of Virology* 62, 2300-2306; Greve, J. M. et al. 1989, *Cell* 56, 839-847). Andere radioaktive Bindungstests basieren auf Blot-Assays, in denen Zellextrakte auf eine Nitrozellulosemembran aufgedotet oder nach SDS-PAGE geblotted werden und diese dann mit radioaktiv markierten Viren inkubiert werden. Gebundene Viren können nach Exposition auf einem Röntgen-Film nachgewiesen werden (Bass, D. M. et al. 1991, *Virology* 183, 602-610; Roivainen, M. et al. 1994, *Virology* 302, 357-365). Weniger Ansätze wurden mit nicht radioaktiven Bindungstests durchgeführt. Zum Beispiel benutzten Mizukami et al. (*Virology* 217, 124-130, 1996) biotinylierte AAV anstelle radioaktiv markierter Viren, die mit Hilfe von markiertem Streptavidin nachgewiesen wurden. Herrmann et al. (*Journal of Virology* 69, 6797-6804, 1995) messen die Bindung von B-lymphotropen Papovaviren an B-lymphome Zelllinien mittels eines Kapsidprotein-ELISA's während Tresnan et al. (*Virology* 211, 123-132, 1995) die von leeren Kapsiden des Canine Parvovirus gebundenen Zellen durch FACS-Analyse bestimmen. Mit Hilfe dieser Bindungstests kann nicht nur die direkte Bindung von Viren an die Zelle bestimmt werden, sondern auch die Blockierung dieser Bindung durch monoklonale Antikörper (Mak) untersucht werden. Dabei werden Zellen mit Mak inkubiert bevor eine Inkubation mit radioaktiv markierten Viren erfolgt und die an Zellen gebundene Radioaktivität gemessen wird (Roden, R. B. S. et al. 1994, *Journal of Virology* 68, 7570-7574; Shepley, M. P. et al. 1988, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85, 7743-7747; Bergelson, J. M. et al. 1992, *Science* 255, 1718-1720). Brown, K. E. et al. (*Science* 262, 114-117, 1993) bestimmt über "colony-forming units" Maks, welche die Bindung des B19 Parvovirus an die Zelle unterbinden.

Vorzugsweise wurden die in der vorliegenden Patentanmeldung beschriebenen monoklonalen Antikörper über einen weiteren nicht radioaktiven Ansatz isoliert. Dieser wird nachfolgend anhand von AAV-2 beschrieben, was jedoch nicht als darauf beschränkt auszulegen ist. Der nicht-radioaktive Bindungsassay wurde speziell für die Isolierung von monoklonalen Antikörpern entwickelt, welche die Bindung von AAV-2 an die Zelle inhibieren. Im diesem Test wurden AAV-2 Viren mit Hybridomüberständen vorinkubiert, um dann mit Zellen inkubiert zu werden. Diese Zellen mit den an sie gebundenen Viren wurden fixiert und unspezifische Bindungsstellen geblockt, um dann die gebundenen Viren mittels Kapsid-ELISAs nachzuweisen. In dem Kapsid-ELISA wird ein an AAV-2 bindender, biotinylierter monoklonaler Antikörper benutzt, der durch Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen werden kann. Beim "screening" der Hybridomüberstände wurde nach einem negativen ELISA Ergebnis gesucht. Wenn der gesuchte monoklonale Antikörper in der Lage ist, an AAV-2 zu binden und die Bindung des Virus an die Zelle zu verhindern, wird kein Signal im ELISA erzielt, da nur AAV-2 Partikel, welche an Zellen binden, nachgewiesen werden.

Nicht-Bindung eines Virus hat Nicht-Infektion zur Folge. Allerdings sind diese beiden Vorgänge nicht identisch, da ein Virus Zellen binden kann, jedoch nicht gleichzeitig in die Zelle aufgenommen werden muß, was deren Infektion zur Folge hätte.

Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern sind dem Fachmann bekannt. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern umfaßt beispielsweise als ersten Schritt die Herstellung von polyclonalen Antikörpern unter Verwendung von AAV-Kapsidproteinen oder Fragmenten davon (beispielsweise synthetische Peptide) mit geeigneten Ligandensequenzen, beispielsweise die in den Beispielen beschriebenen Peptide oder Fragmente davon, als Immunogen zur Immunisierung geeigneter Tiere und die Gewinnung von gegen das definierte Antigen Antikörper produzierenden Zellen, z. B. sensibilisierten B-Lymphozyten. Dann werden beispielsweise Zell-Hybride aus Antikörper produzierenden Zellen und Knochenmark-Tumorzellen (Myelomzellen) hergestellt und cloniert. Anschließend wird ein Clon selektioniert, der einen Antikörper produziert, der für das verwendete Antigen spezifisch ist. Dieser Antikörper wird dann hergestellt. Beispiele von Zellen, die Antikörper produzieren, sind Milzzellen, Lymphknoten Zellen, B-Lymphozyten etc.. Beispiele von Tieren, die zu diesem Zweck immunisiert werden können, sind Mäuse, Ratten, Pferde, Ziegen und Kaninchen. Die Myelomzellen lassen sich aus Mäusen, Ratten, Menschen oder anderen Quellen erhalten. Die Zellfusion kann man beispielsweise durch das allgemein bekannte Verfahren von Köhler und Milstein durchführen. Die durch Zellfusion erhaltenen Hybridome werden mittels dem Antigen nach dem Enzym-Antikörper-Verfahren oder nach einem ähnlichen Verfahren abgesucht. Clone werden beispielsweise mit dem Grenz-Verdünnungsverfahren erhalten. Die erhaltenen Clone werden beispielsweise BALB/c-Mäusen intraperitoneal implantiert, nach 10 bis 14 Tagen wird der Ascites der Maus entnommen, und der monoklonale Antikörper durch bekannte Verfahren (beispielsweise Ammoniumsulfatfraktionierung, PEG-Fraktionierung, Ionenaustauschchromatographie, Gelchromatographie oder Affinitätschromatographie gereinigt.

Der gewonnene Antikörper kann direkt verwendet werden oder es kann ein Fragment davon verwendet werden. In die-

sem Zusammenhang bedeutet der Begriff "Fragment" alle Teile des monoclonalen Antikörpers (z. B. Fab-, Fv- oder "single chain Fv"-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der genannte monoclonale Antikörper ein aus einem Tier (z. B. Maus) stammender Antikörper, ein humanisierter Antikörper, ein chimärer Antikörper, ein humaner Antikörper oder ein Fragment davon. Chimäre, menschlichen Antikörper ähnelnde oder humanisierte Antikörper besitzen eine herabgesetzte potentielle Antigenität, jedoch ist ihre Affinität gegenüber dem Ziel nicht herabgesetzt. Die allgemeine Herstellung von chimären und humanisierten Antikörpern bzw. von menschlichen Antikörpern ähnelnden Antikörpern wurde ausführlich beschrieben (siehe beispielsweise Queen et al., PNAS USA 86, S. 10029, 1989; Verhoeven et al., Science 239, S. 1534, 1988). Humanisierte Immunglobuline weisen variable Grundgerüstbereiche auf, die im wesentlichen von einem humanen Immunglobulin stammen (mit der Bezeichnung Akzeptor-Immunglobulin) und die Komplementarität der determinierenden Bereiche, die im wesentlichen von einem nicht-menschlichen Immunglobulin (z. B. von der Maus) stammen (mit der Bezeichnung Donor-Immunglobulin). Die (der) konstante(n) Bereich(c) stammt/stammen, falls vorhanden, auch im wesentlichen von einem menschlichen Immunglobulin. Bei der Verabreichung an menschliche Patienten bieten humanisierte (sowie humane) Antikörper eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern von Mäusen oder anderen Spezies: (a) das menschliche Immunsystem sollte das Grundgerüst oder den konstanten Bereich des humanisierten Antikörpers nicht als fremd erkennen und daher sollte die Antikörper-Antwort gegen einen solchen injizierten Antikörper geringer ausfallen als gegen einen vollständig fremden Maus-Antikörper oder einen partiell fremden chimären Antikörper; (b) da der Effektorbereich des humanisierten Antikörpers menschlich ist, dürfte er mit anderen Teilen des menschlichen Immunsystems besser interagieren, und (c) injizierte humanisierte Antikörper weisen eine Halbwertszeit auf, die im wesentlichen zu der von natürlich vorkommenden menschlichen Antikörpern äquivalent ist, was es erlaubt, kleinere und weniger häufige Dosen im Vergleich zu Antikörpern anderer Spezies zu verabreichen. Diese Vorteile gelten natürlich ebenso für humane Antikörper.

- In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Antikörper um einen Antikörper oder ein Fragment davon, der an das Kapsid von AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 oder AAV-6 bindet und die Bindung des Virus an den Virusrezeptor der ursprünglichen Zielzelle verhindert.

Besonders bevorzugt sind unter den vorstehend beschriebenen Antikörpern oder Fragmenten davon solche, die an die Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3, insbesondere im Bereich der Aminosäuren 449-475, 545-556 und 585-598 (bezogen auf VP1 von AAV-2), binden.

- Erfindungsgemäße Antikörper können aus den bei der DSMZ, Mascheroder Weg, Braunschweig unter den Nummern ACC 2369 (ergibt C24-B) und ACC 2370 (ergibt C37-B) am 19. August 1998 hinterlegten Hybridoma-Zelllinien gewonnen werden. Diese sind gegen AAV-2 gerichtet.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die vorstehend beschriebenen monoclonalen Antikörper, die außerdem dadurch gekennzeichnet sind, daß sie mit einem gewünschten Rezeptorliganden fusioniert sind und somit dazu dienen können, AAV-Vektoren mit einem erweiterten bzw. reduzierten Wirtsbereich – in Abhängigkeit von der eingeführten neuen Ligandensequenz – zu konstruieren. Als Rezeptorliganden eignen sich alle Liganden, die eine Erweiterung bzw. Reduzierung und somit eine gezielte Veränderung des Wirtsbereichs bewirken. Es eignen sich hierfür auch Liganden, die vorrangig an Rezeptoren von malignen Zellen binden. Hier kommen zum Beispiel die folgenden Liganden in Frage:

- Folat, da der Folatrezeptor vermehrt in Gebärmutter-, Lungen- und Brust-Karzinomen, sowie Gehirntumoren exprimiert wird,
- "Fibroblast Growth Factor" (FGF), da der "high-affinity" FGF Rezeptor in malignen Zelllinien (z. B. SKOV 3.ip1 eine menschliche Gebärmuttertumorzelllinie) und Primärzellen (z. B. Kaposi's Sarkoma Zellen) sowie proliferierenden Endothelzellen in Tumoren zu finden ist.
- RGD Peptidmotive, die an α_v -Integrine binden, welche fast ausschließlich an Endothelzellen von angiogenen Kapillaren in Tumoren (Melanomen, Karzinomen, Sarkomen)
- Epidermal Growth Factor (EGF)
- CD 19

- zu finden sind.

Neben Rezeptorliganden, die sich zum "Targeting" von Tumorzellen eignen, sind auch Liganden für jene Rezeptoren von großer Bedeutung, die die Infektion von Zielzellen erlauben, welche die Behandlung von genetischen Krankheiten ermöglichen. Hier seien z. B. genannt:

- "anti-human secretory component Fab-Fragments". Sie binden an den "polymeric immunoglobulin receptor" (pIGR) zum Gentransfer in Epithelzellen der Atemwege als Behandlungsmethode der zystischen Fibrose,
- Asialoglycoprotein (ASGP) zum Gentransfer in die Leber.
- Erythropoietin, zum "Targeting" von hematopoietischen Zellen, die den Erythropoietin-Rezeptor tragen, beispielsweise für die Behandlung von Sichelzellanämie.

- Weiterhin gibt es monoklonale Antikörper, die anstelle von Liganden spezifisch an bestimmte Rezeptoren binden. Diese sind außerdem als potentielle Fusionspartner an die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper von großer Bedeutung.

- Zur Konstruktion dieser fusionierten Antikörper oder Fragmente davon gibt es eine Reihe von verschiedenen Möglichkeiten. Beispielsweise kann eine direkte Kopplung eines Antikörperfragments, beispielsweise eines Fab-Fragments, mit den Ligandensequenzen, die an den Rezeptor der gewünschten Zielzelle binden, erfolgen. Eine große Vielfalt von Reagenzien zur chemischen Kopplung, auch "cross-linker" genannt, sind in den letzten Jahrzehnten entwickelt worden. Allgemein kann man diese Kopplungsreagenzien, welche wenigstens zwei reaktive Gruppen während der Kopplung zur

Verfügung stellen, in homo- und heterobifunktionale "cross-linker" unterteilen. Erstere besitzen wenigstens zwei identische reaktive Gruppen und erlauben eine Ein-Schritt-Kopplung, während letztere wenigstens zwei unterschiedliche reaktive Gruppen besitzen und eine sequentielle Konjugation von Proteinen erlauben. Die am häufigsten verwendeten "cross-linker" sind homobifunktional und reagieren mit den primären Aminogruppen von Proteinen. Dazu gehören Imidoester und NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimide). NHS-Ester sind stabiler und effizienter als Imidoester und reagieren mit primären sowie sekundären Aminen, um eine Amidbindung zu formen. Weitere homobifunktionale "cross-linker" sind Sulfhydryl-Reagenzien, die mit Thiolgruppen reagieren, sowie andere Konjugationsreagenzien, welche mit anderen reaktiven Gruppen interagieren (Arginin-spezifische oder carbonyl-spezifische "cross-linker") oder keine Selektivität zeigen (z. B. Photoaffinitätsreagenzien). Die vorstehend erwähnten "cross-linker" verbinden Proteine über Brücken, die eine unterschiedliche Entfernung der Proteine erlauben. Als Methode, bei der keine Brücken gebildet werden, ist die Carbodiimid-Methode bekannt, bei der Carboxylgruppen mit primären Aminen über eine Amidbindung verbunden werden. Bei der Auswahl von Kopplungsreagenzien müssen vor allem der Reaktionspuffer und pH in welchem der "cross-linker" aktiv ist und die Stabilität der zu koppelnden Proteine in diesem Medium in Betracht gezogen werden. Alternativ kann auch die Bindungssequenz des monoclonalen Antikörpers als Einzelketten-Antikörper cloniert werden. Der dafür entwickelte Ansatz in der Klonierung von scFv bestand in der direkten Klonierung der Antikörpergene aus Hybridom-Zelllinien. Dabei werden die variablen Bereiche der leichten und schweren Kette durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe von antikörperspezifischen Oligonucleotidprimern amplifiziert. (F. Breitling & S. Dübel, Rekombinante Antikörper, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1997) Die clonierten Einzelketten-Antikörper können beispielsweise an einer Phagenoberfläche innerhalb einer Phagenbank exprimiert werden, um so deren Bindung an AAV-Kapside beispielsweise mittels ELISA zu untersuchen. Nur solche Einzelketten-Antikörper, die gute Bindung zeigen, werden weiterverwendet, um sie beispielsweise in *E. coli* zu exprimieren. Mit den exprimierten und beispielsweise über "His-tags" gereinigten Einzelketten-Antikörpern kann dann erneut deren Fähigkeit zur Kompetition der Bindung des Virus an den Rezeptor der ursprünglichen Zielzelle überprüft werden. Im Anschluß daran können die so gewonnenen Einzelketten-Antikörper mit den gewünschten Ligandensequenzen oder mit einem zweiten Einzelketten-Antikörper fusioniert werden. Die Herstellung von scFv mit multivalenten sowie multifunktionellen Eigenschaften kann dabei durch verschiedene Ansätze erreicht werden. Einige scFv zeigen ein natürliches Multimerisierungspotential, wobei die variablen Domänen eines scFv mit den komplementären Domänen eines anderen scFv miteinander binden. Andere scFv können durch die Fusion mit einem "Leucine Zipper" oder einer amphipatischen Helix am C-terminus miteinander fusioniert werden. Ein multifunktionaler Ansatz betrifft die Fusion eines scFv mit Streptavidin. Biotinylierte Liganden, monoklonale Antikörper oder weitere scFv können nun einfach mit den scFv-Streptavidin konjugiert werden. Diese einfache Konjugation an potentielle Bindungspartner wird auch durch das Einführen von C-terminalen Cysteinen erreicht, welche über Disulfidbrücken stabile Dimere bilden. Die direkte Fusionierung von zwei scFv resultiert in einem bivalenten und bispezifischen "diabody". Hier wird die VH Domänen eines scFv über einen kurzen Linker mit der VL Domäne des anderen scFv verbunden sowie das komplementäre VH-VL Paar. (Little et al. *Methods in Molecular Medicine*, 555-622, Vol 13: *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*, Humana Press Inc. Totowa NJ). Nach Expression, beispielsweise in *E. coli*, können solche Antikörper-Fusionsproteine bzw. bivalenten Antikörper zur Herstellung von modifizierten AAV-Vektoren für den selektiven Gentransfer verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ferner einen AAV-Vektor, vorzugsweise auf AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 oder AAV-6 basierend, der dadurch gekennzeichnet ist, daß die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen monoclonalen Antikörper oder Fragmente davon an sein Kapsid gebunden ist und dieses nicht mehr an den Virusrezeptor der ursprünglichen Zielzelle binden kann, jedoch gegebenenfalls an den Virusrezeptor einer gewünschten Zielzelle. Ein solcher Vektor erlaubt die Einführung von Fremd-DNA in eine gewünschte Zielzelle.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch den vorstehend beschriebenen Vektor, der zusätzlich eine Fremd-DNA enthält. Dieser kann beispielsweise durch Kointransfektion eines AAV-Vektorplasmids, welches eine zu exprimierende Fremd-DNA zwischen den "inverted terminal repeats" (ITR) von AAV trägt, mit einem AAV-Helferplasmid in eine Produktionszelllinie (z. B. 293T-Zellen) und Überinfektion mit einem Helfervirus (z. B. Ad2, Ad5 oder HSV-1) gewonnen werden (Fig. 1 A). Alternativ können die notwendigen Funktionen des Helfervirus auch auf dem AAV-Helferplasmid vorliegen, wodurch das Herstellungsverfahren vereinfacht wird (Fig. 1B). Die zu exprimierende Fremd-DNA kann ein Reportergen oder ein therapeutisch interessantes Gen enthalten. Diese Fremd-DNA sollte eine Größe von maximal ca. 4,7 Kilobasen nicht überschreiten und kann von einem Fachmann nach seinen Wünschen ausgewählt werden. Die rekombinanten AAV-Viren (Vektoren) können durch Zellyse aus den transfizierten Zellen freigesetzt werden. Eine Modifikation der Kapside mit den beschriebenen Antikörpern kann im Zellysat oder nach Reinigung der Vektoren durchgeführt werden kann. Die Reinigung kann über verschiedene Methoden erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind.

Der AAV-Vektor ist vorzugsweise so modifiziert, daß er Zielzellen über verschiedene Rezeptoren binden kann. Als Zielzellen kommen z. B. Tumorzellen mit Rezeptoren wie dem Folat-Rezeptor, dem "epidermal growth factor"-Rezeptor und "fibroblast growth factor"-Rezeptor bzw. Rezeptoren von hematopoietischen Zellen, wie der Erythropoietin Rezeptor, SCF Rezeptor und CD 34 in Frage. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen AAV-Vektors, das die in den vorstehenden Abschnitten beschriebenen Schritte umfaßt.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum gerichteten Gentransfer, das dadurch gekennzeichnet ist, daß als Vehikel für die in die gewünschte Zielzelle einzuschleusende Nucleinsäuresequenz der erfindungsgemäße AAV-Vektor verwendet wird. Die einzuschleusende Nucleinsäuresequenz kann dabei beispielsweise unter der Kontrolle eines induzierbaren und/oder reprimierbaren, zelltyp-spezifischen Promotors liegen. Die erfindungsgemäßen AAV-Vektoren können in eine Zelle, ein Gewebe, Organ, einen Patienten oder ein Tier durch eine Reihe von Verfahren eingeführt werden, z. B. durch ex vivo Inkubation der gereinigten AAV-Vektoren mit den gewünschten Zielzellen (z. B. Maas et al. *Human Gene Therapy* 9, 1049-1059 (1998), Zhou et al. *Gene Therapy* 3, 223-229 (1996), Ponnazhagan et al. *Journal of Virology* 71, 8262-8267 (1997)), bzw. durch direkte Injektion in ein Zielgewebe (z. B. Xiao et al. *Journal of Virology* 70, 8098-8108, Flannery et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6916-6921 (1997), During et al., *Gene Therapy* 5, 50-58 (1998)).

Schließlich können im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Zellen und transgene Tiere (d. h. Säuger) die bezüglich der mittels des erfindungsgemäßen AAV-Vektors eingeschleusten Nucleinsäuresequenz transgen sind, erhalten werden. Verfahren zur Herstellung solcher transgener Tiere können beispielsweise in WO 91 /08216 gefunden werden.

Die vorliegende Erfindung wird weiter anhand der Figur beschrieben:

5 Fig. 1 A,B: Schematische Darstellung von Verfahren zur Herstellung von AAV-Vektoren

Fig. 2: Schematische Darstellung des Tests zur Isolierung von Antikörpern, die die Bindung des Virus an die Zelle blockieren.

Fig. 3: "Retargeting" von AAV-2

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung.

10

Beispiel 1

Herstellung von gegen die Ligandensequenzgerichteten Antikörpern

15 Zur Herstellung von Antikörpern wurden Balb-c Mäuse wiederholt mit synthetischen Peptiden sowie mit leeren AAV-2 Kapsiden immunisiert. Die nachfolgenden vier Peptide wurden aufgrund von AAV-2 Kapsidensequenzen, in denen sich AAV-2 und AAV-3 unterscheiden, synthetisiert. Die Peptide hatten die folgende Sequenz:

AAV-2-1: GPPPPKPAERHKDDSC

20 AAV-2-2: SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDRDQSC

AAV-2-3: QSGVLIIFGKQGSEKTNVDIEKC

AAV-2-4: SVSTNLQRGNRQAATADVTQTC

Die beiden Viren AAV-2 und AAV-3 haben einen unterschiedlichen Zelltropismus, obwohl sich ihre Kapsidensequenzen in nur vier Domänen geringfügig voneinander unterscheiden. Da Peptide nur lineare Epitope darstellen, aber die Ligandensequenz auf dem viralen Kapsid auch ein konformatives Epitope darstellen kann, wurde zusätzlich mit leeren AAV-2 Kapsiden geboostet.

Pro Immunisierung wurden 100 µg Peptid bzw. 30 µg leere (keine DNA enthaltende) assemblierte AAV-2-Kapside in 0,1 ml PBS und 0,1 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans (icFA) eingesetzt:

30

Tag 0: 1. Immunisierung (Peptide + komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 24: 2. Immunisierung (Peptide + icFA)

Tag 41: 3. Immunisierung (Kapside + icFA)

Tag 132: 4. Immunisierung (Kapside + icFA)

35 Tag 145: Fusion

Nach Abschluß der Immunisierung wurde die Milz einer Maus entnommen und die daraus isolierten Milzzellen mit Ag8 Zellen fusioniert. Die so entstandenen Klone sondern Antikörper in das Medium ab, welches nun mit verschiedenen Essays auf seine Eigenschaften getestet wurde. Zunächst wurden alle Hybridomüberstände auf ihre Fähigkeit zu neutralisieren geprüft. In diesem auf GFP (green fluorescent protein) basierenden Neutralisationstest fand auch ein "Screenen" der monoklonalen Antikörper statt. Zellen wurden in 96 Lochplatten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit einem Mix aus AAV-2 GFP-Partikel (MOI 10) und Hybridomüberständen inkubiert. 20 Stunden nach Infektion wurden die Zellen hinsichtlich der Expression von GFP unter UV-Licht untersucht. Hybridomüberstände, welche neutralisierend wirkten, also solche die die Expression von GFP verhindern, konnten nun auf ihre Fähigkeit, die Bindung von AAV-2 an den zellulären Rezeptor zu unterbinden, untersucht werden. Dieser nicht-radioaktive Bindungstest wurde speziell für diese Aufgabe entwickelt (s. Fig. 2). Dazu wurden Hybridomüberstände zuerst mit AAV-2 inkubiert bevor diese auf Zellen, z. B. HeLa-Zellen, gegeben wurden. Die an die Zelle bindenden AAV-2 Partikel wurden fixiert. Hybridomüberstände, welche an AAV-2 binden und die Bindung des Kapsids an den zellulären Rezeptor unterbinden, verhindern die Bindung an die Zellen. Nach einem Blockierungsschritt werden die an die Zellen gebundenen Viren mit dem monoklonalen A20-Antikörper, welcher assemblierte AAV-2 Kapside erkennt, nachgewiesen (Wistuba et al., Journal of Virology 71, S. 1341-1352, 1997). Die so charakterisierten Klone, welche neutralisierende und die Bindung inhibierende Antikörper produzieren, wurden daraufhin vereinzelt, um monoklonale Antikörper (Mak) zu gewinnen. Die so erhaltenen Moks wurden wiederum auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Neben den soeben beschriebenen Assays wurden sie weiterhin auf ihr Verhalten in Immunfluoreszenzen von Ad-5 (Negativkontrolle) sowie Ad-5/AAV-2 infizierten Zellen, Western Blots von Ad/AAV-2 HeLa Extrakten und im AAV-2 ELISA untersucht. Nach Analyse dieser Daten und einer Subklassenbestimmung wurden die beiden Hybridome C24-B und C37-B ausgesucht. Die folgende Tabelle zeigt ihre Eigenschaften:

60

65

Assay	C24-B	C37-B
Neutralisationstest	+	+
Bindungstest	+	+
Western Blot Analyse	-	-
Immunfluoreszenz Adeno/AAV-2 infizierte Zellen	+	+
Adeno-infizierte Zellen	-	-
AAV-2 ELISA	+	+
Immunoglobulinsubklasse	IgG1	IgG1

Die beiden Hybridome wurden bei der DMSZ in Braunschweig am 19.8.1998 unter den folgenden Nummern hinterlegt:

C24-B: ACC 2369

C37-B: ACC 2370

Beispiel 2

Herstellung von fusionierten Einzelketten-Antikörpern

Von beiden Hybridomen, C24-B und C37-B, wurden Einzelketten-Antikörper (scFv) hergestellt. Nach Isolierung von RNA, mRNA und darauffolgende Synthese von cDNA konnte mit Hilfe von Oligonukleotidprimern, deren Sequenz in Breitling et al., Methods in Molecular Medicine, S. 581-592, Vol. 13: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases, Humana Press Inc. Totowa NJ publiziert ist, in der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) die variablen Domänen der leichten (VL) und der schweren Kette (VH) isoliert werden. Diese wurden gemäß Standardmethoden in das Expressionsplasmid pHOG21 (Kipriyanov, S. M. et al., 1997, J. of Immunol. Methods 200, S. 69-77) kloniert.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Little am DKFZ werden dann "diabodies" hergestellt. Diese "diabodies" sind bivalent und bispezifisch, da sie aus zwei miteinander fusionierten scFv bestehen. Dabei wird die VH Domäne des einen Antikörpers (C24-B oder C37-B) durch einen kurzen Linker mit der Sequenz "AKITPKLGG" (Peptidlinker, welcher die ca. 3,5 nm zwischen dem C-Terminus der einen Domäne und dem N-Terminus der anderen Domäne überbrückt (Kipriyanov, S. M. et al. Int. J. Cancer 77, S. 763-772, 1998) mit der VL Domäne eines anderen Antikörpers (anti-CD19) verbunden und umgekehrt. Allgemeine Hinweise zur Herstellung von diabodies sind "Little et al., Methods in Molecular Medicine 555-580, Vol. 13: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases, Humana Press Inc. Totowa NJ" zu entnehmen. Dadurch entsteht ein Produkt, welches zwei Antigen-Bindungsdomänen besitzt, welche an gegenüberliegenden Seiten des Komplexes liegen.

Die obigen "diabodies" werden sich aus den scFv von C24-B bzw. C37-B und scFv von Antikörpern, die an B-Zellen binden, zusammensetzen. Allerdings besteht die Möglichkeit alle scFv, welche gegen Zellrezeptoren gerichtet sind, in diese "diabodies" einzubauen.

Beispiel 3

Chemische Kopplung von Fab-Fragmenten

Fab-Fragmente von C24-B und C37-B wurden gemäß Standardmethoden isoliert. Diese werden nun mit IgGs, die gegen EGF und FGF Rezeptoren gerichtet sind, oder mit Folat, dem Liganden des Folatrezeptors, chemisch gekoppelt. Die Konjugation erfolgt mit Hilfe von SPDP(3-(2-Pyridyldithio)propionic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester). Die entstandenen Komplexe werden über HPLC aufgereinigt und können nun eingesetzt werden, den Zelltropismus von AAV-Vektoren zu verändern. Dazu werden AAV-Vektoren mit den gereinigten Fab-IgG/Liganden Komplexen inkubiert. Die nicht an die AAV-Vektoren gebundenen Komplexe werden (z. B.) durch Zentrifugation durch ein Zuckerkissen abgetrennt.

Insbesondere werden AAV-2 Vektoren mit den Luciferase bzw. LacZ Reportergenen eingesetzt, um eine quantitative und qualitative Aussage über die erzielte Expressionseffizienz zu erhalten. Es können aber natürlich alle verfügbaren AAV-Vektoren eingesetzt werden. Diese Vektoren werden dann mit den Fab-IgG/Ligand Komplexen inkubiert.

Änderung des Tropismus von rAAV-2

- 5 Die in Beispiel 2 beschriebenen "diabodies" und in Beispiel 3 beschriebenen Fab-IgG/Liganden Konjugate können nun zur Änderung des Tropismus von rAAV-2 eingesetzt werden.
- Zwei generelle Anwendungsmöglichkeiten bieten sich an. Zum einen werden die Fab-IgG/Liganden Konjugate eingesetzt, um das Prinzip zu testen, daß rAAV-2 Zellen über einen neuen Rezeptor infizierbar sind. Nach Kopplung von Fab Fragmenten an den Liganden Folat zum Beispiel und darauffolgender Inkubation mit rAAV-2, wird gezeigt, daß Zellen (z. B. HeLa, KB), welche den Folatrezeptor überexprimieren, infizierbar sind. Diese Infektion kann nicht durch einen Überschuß an Heparin, welches die natürliche AAV-2 Infektion hemmt, wohl aber durch die Gegenwart von freien Fab Fragmenten oder einem Überschuß von Folat im Medium verhindert werden. Mit Hilfe von Zelllinien, welche z. B. den EGF Rezeptor exprimieren (MDA, MB468 oder U118), kann anhand des Fab-anti-EGFR-IgG Konjugates analog zu den oben geschildertem Beispiel mit dem Folat-Liganden ein "retargeting" an den EGFR gezeigt werden. (Siehe Fig. 3). Eine Änderung des Tropismus ist aber auch über die beschriebenen "diabodies" möglich. Diese werden eingesetzt, um für AAV-2 schlecht infizierbare Zellen (z. B. die Zelllinien Raji [human Burkitt lymphoma cell line], 9023 und 9050 [human lymphoblastoid cell lines]; Maass, G. et al. Human Gene Therapy 9, 1049-1059, 1998) einer AAV-2 Infektion zugänglicher zu machen. Hierzu werden die "diabodies" mit rAAV-2 inkubiert, die nicht an die AAV Kapside gebundenen "diabodies" abgetrennt und dann auf die oben genannten Zellen gegeben. Damit ist nun eine effiziente Infektion, der von nicht modifiziertem AAV-2 kaum infizierbaren Lymphomzelllinien möglich.

Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon, **dadurch gekennzeichnet**, daß er an das Kapsid eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) bindet und die Bindung des Virus an den Virusrezeptor einer ursprünglichen Zielzelle verhindert.
2. Antikörper nach Anspruch 1, wobei der Antikörper ein aus einem Tier stammender Antikörper, ein humaner bzw. humanisierter Antikörper, ein chimärer Antikörper, ein Einzelketten-Antikörper oder ein Fragment davon ist.
3. Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 1 oder 2, wobei das AAV AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 oder AAV-6 ist.
4. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3, der an gemeinsame Sequenzen von V1, VP2 oder VP3 bindet.
5. Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 4, der an die Kapsidproteine von AAV-2 im Bereich der Aminosäuren 449 bis 600 (bezogen auf VP-1) bindet.
6. Antikörper nach Anspruch einem der Ansprüche 1 bis 5, der C24-B (bei der DSMZ, Braunschweig am 19. August 1998 unter ACC 2369 hinterlegt) oder C37-B (bei der DSMZ Braunschweig am 19. August 1998 unter ACC 2370 hinterlegt) ist.
7. Antikörper oder Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 6, außerdem dadurch gekennzeichnet, daß er mit einem gewünschten Rezeptorliganden fusioniert ist.
8. Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 7, wobei der Rezeptorligand
 - Folat,
 - "Fibroblast Growth Factor" (FGF),
 - RGD Peptidmotive, die an α_v -Integrine binden,
 - Asialoglycoprotein (ASGP),
 - Erythropoietin
 - Epidermal Growth Factor (EGF), oder
 - ein Antikörper, der gegen einen gewünschten Rezeptor gerichtet ist, z. B.:
 - anti-human secretory component Fab-Fragment
 - anti-CD 19
9. Hybridom, einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 8 erzeugend.
10. AAV-Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper oder ein Fragment davon nach einem der Ansprüche 1 bis 8 an das Kapsid gebunden ist und dieses nicht mehr an den Virusrezeptor der ursprünglichen Zielzelle binden kann, jedoch gegebenenfalls an den Virusrezeptor einer gewünschten Zielzelle.
11. AAV-Vektor nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er von AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 oder AAV-6 abgeleitet ist.
12. Verfahren zum gerichteten Gentransfer, dadurch gekennzeichnet, daß als Vehikel für die in die gewünschte Zielzelle einzuschleusende Nucleinsäuresequenz ein AAV-Vektor nach Anspruch 10 oder 11 verwendet wird.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

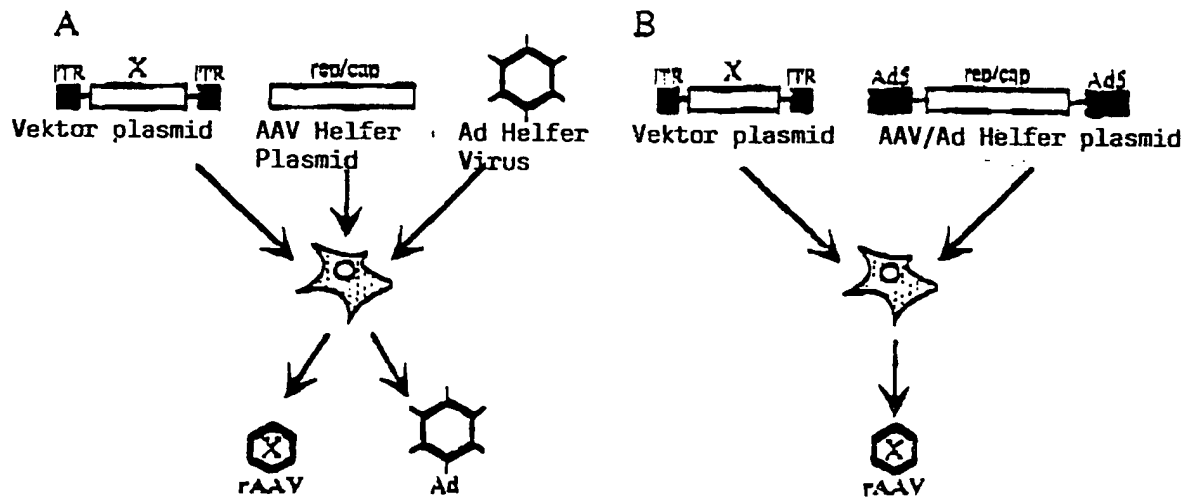


Fig. 1

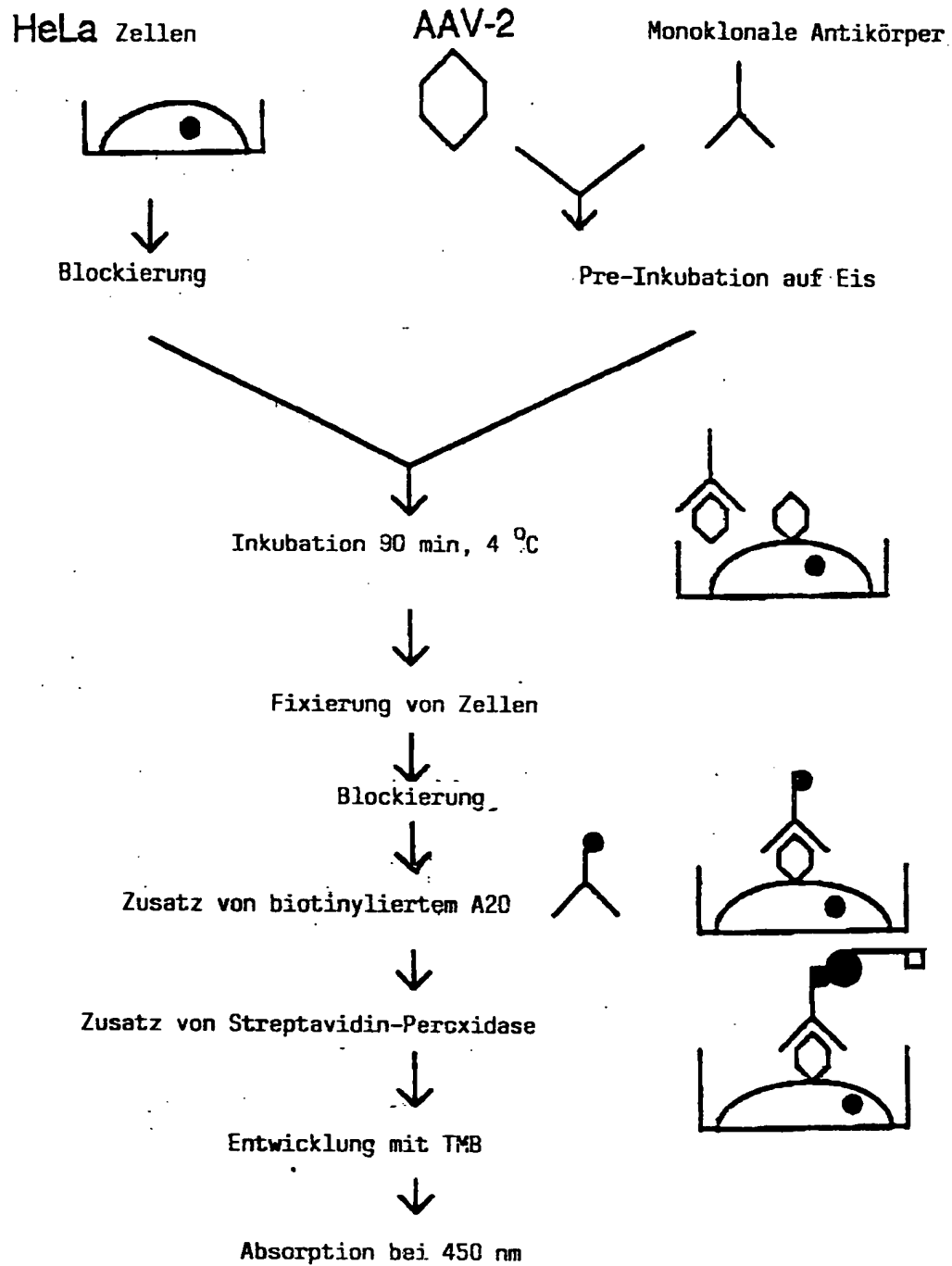
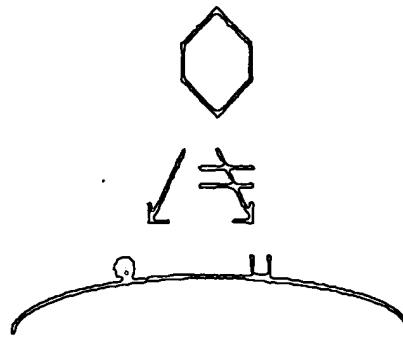
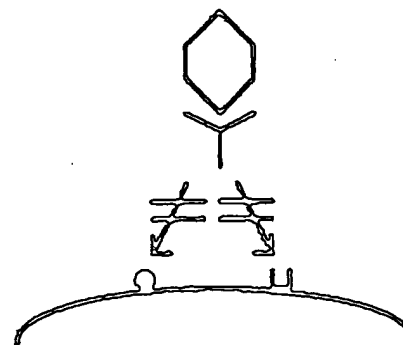


Fig. 2

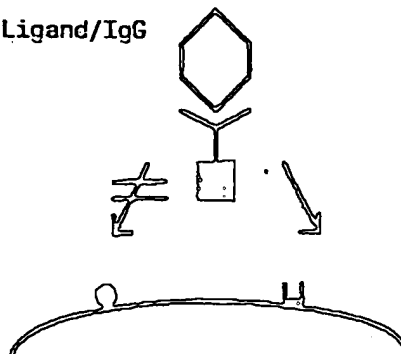
A: AAV-2 Bindung an Zellen



B: AAV-2 komplexiert an Fab Fragment

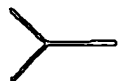


C: Konjugation von Fab an Ligand/IgG

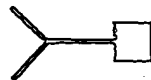


○ AAV-2 Rezeptor

□ AAV-2 Targetrezeptor



C24-B/C37-B Fab-Fragment



C24-B/C37-B Fab-Fragment
konjugiert an Ligand/IgG

Fig. 3

HPS Trailer Page
for

EAST

UserID: AWehbe_Job_1_of_1

Printer: cm1_12e14_gbejptr

Summary

<u>Document</u>	<u>Pages</u>	<u>Printed</u>	<u>Missed</u>	<u>Copies</u>
DE019849643A1	12	12	0	1
Total (1)	12	12	0	-

AWehbe_Job_1_of_1

Printed by HPS Server
for

EAST

Printer: cm1_12e14_gbejptr

Date: 05/30/03

Time: 18:38:41

Document Listing

Document	Selected Pages	Page Range	Copies
WO009840508	205	1 - 205	1
Total (1)	205	-	-